

22985

①⑨ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 198 05 012 A 1**

⑤① Int. Cl.⁶:
A 61 K 49/00
A 61 B 8/00

②① Aktenzeichen: 198 05 012.7
②② Anmeldetag: 7. 2. 98
④③ Offenlegungstag: 12. 8. 99

DE 198 05 012 A 1

⑦① Anmelder:
Gieselmann, Thomas, 56288 Kastellaun, DE

⑦④ Vertreter:
Müller-Gerbes, M., Dipl.-Ing., Pat.-Anw., 53225
Bonn

⑦② Erfinder:
gleich Anmelder

⑤⑥ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
zu ziehende Druckschriften:

DE	196 26 530 A1
DE	44 06 474 A1
DE	43 28 642 A1
EP	04 94 615 A1
WO	96 26 746 A1
WO	96 18 420 A1
WO	93 13 808 A2
WO	92 11 873 A1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

- ⑤④ Kontrastmittel zur Verwendung als Diagnostikum bei bildgebenden Verfahren sowie seine Herstellung
- ⑤⑦ IV-Kontrastmittel, enthaltend eine aufgeschäumte Zubereitung auf Basis einer wäßrigen Lösung von Polyoxy-ethylen-660-12-Hydroxystearat und eines anionischen Phospholipides und Verfahren zur Herstellung desselben und Verwendung als Diagnostikum bei bildgebenden Verfahren.

DE 198 05 012 A 1

DE 198 05 012 A 1

Beschreibung

Die Erfindung bezieht sich auf ein intravenös verabreichbares (IV) Kontrastmittel zur Verwendung als Diagnostikum bei bildgebenden Verfahren sowie seine Herstellung.

- 5 In der Medizin hat die Ultraschalldiagnostik wegen ihrer komplikationslosen und einfachen Handhabung zwischenzeitlich eine sehr breite Anwendung gefunden. Das Prinzip der Ultraschalldiagnostik beruht darauf, daß die Schallwellen von Organen und deren Grenzen unterschiedlich reflektiert werden. Durch elektronische Verstärkung werden diese Echosignale sichtbar gemacht.

- 10 Im normalen 2D-Bild (B-Mode) ist die Darstellung des Blutflusses von Gefäßen und inneren Organen nicht möglich. Blut und andere Flüssigkeiten liefern nur dann einen Kontrast im Ultraschall, wenn Dichteunterschiede zur Umgebung bestehen.

In der Medizin werden als Kontrastmittel im Ultraschallbereich Luft bzw. andere Gase verwendet, weil der Impedanzsprung zwischen Gas und umgebendem Blut wesentlich größer ist als der zwischen Flüssigkeiten oder Festkörpern und Blut.

- 15 Bei Ultraschalluntersuchungen des Herzens oder von Gefäßen ist es möglich, die schwachen Reflexionen des Ultraschalls an den roten Blutkörperchen zu nutzen, indem man sich des Doppler-Phänomens bedient. Hiermit ist es möglich, die Blutströme auch ohne Zugabe eines Kontrastmittels sichtbar zu machen.

- Um aber den Blutfluß in tieferliegenden Gefäßen messen bzw. auch sehr niedrige Fließgeschwindigkeiten detektieren zu können, ist die Beimischung kleiner Gasbläschen in den Blutstrom von Vorteil, weil die dadurch hervorgerufene stärkere Reflexion eine bessere Diagnostik ermöglicht.

- 20 Die aus der Literatur bekannten lungengängigen Echokontrastmittel funktionieren auf der Basis von Fremdgasen und es gibt bisher keine Aussagen darüber, ob diese Kontrastmittel auf der Basis von Luft gleichfalls lungengängig sind, siehe beispielsweise Echocardiography: A Jml. of CV Ultrasound & Allied Tech. Vol. 14, No. 5, 1997 S. 441-446 von Thomas R. Porter, M.D., Feng Xie, M.D. und Shouping Li, M.D. "Differences in Myocardial Contrast Produced with Transient Response Imaging When Using Intravenous Microbubbles Containing Gases of Different Molecular Weight" oder "Drugs of the Future 1995, 20 (12): 1224-1227 "Levovist®" von Dr. Thomas Fritzsche und Dr. med. Reinhard Schliefer oder Echocardiography: A Jml. of CV Ultrasound & Allied Techn., Vol. 14, No. 4, 1997, S. 337-343 von Sameh Mobarrek, M.D., Marc Kates, D.O., Maria Meza, M.D., Carlos Moreno, Susan Revall, Wayne Barbee, Ph.D. "Identification of Perfusion Abnormalities Using FS069, a Novel Contrast Agent, in Conscious Dogs" oder Acta Radiologica 38 (1997), Supplement 412, 101-112 von J.-M. Correas, O. Helenon, L. Pourcelot und J.-F. Moreau "Ultrasound Contrast Agents".

- 30 Zwecks Herstellung und anschließender Stabilisierung von Luft- bzw. Gasbläschen sind aus der Literatur mehrere Methoden bekannt. Durch heftiges Schütteln bzw. Rühren von Lösungen, wie Kochsalz oder Farbstofflösungen oder von vorher entnommenem Blut, lassen sich Mikrobläschen erzeugen. Dadurch wird zwar ein Kontrast im Ultraschall erreicht, allerdings verbunden mit dem Nachteil der schlechten Reproduzierbarkeit und stark schwankender Größe der Gasbläschen. Durch verbesserte Verfahren werden diese Nachteile zum Teil aufgehoben.

- 35 Zwecks Anhebung des Kontrastes finden in der Ultraschalldiagnostik Zubereitungen Anwendung, die, wie zum Beispiel agitierte Röntgenkontrastmittel, feinstverteilte Gasbläschen enthalten. In der Literatur werden Galaktosepartikel beschrieben, an denen Luft adsorbiert wird und die freigesetzt werden, sobald diese mit einem geeigneten Lösungsmittel in Kontakt treten.

- 40 Gleichfalls wird aufgeschäumtes und anschließend denaturiertes Protein genauso beschrieben wie eine Substanz, die ein Tensid bzw. ein Tensidgemisch und eine viskositäts erhöhende Substanz enthält.

Bei den augenblicklich zur Verfügung stehenden Kontrastmitteln spielen bezüglich eines eventuellen Risikos hauptsächlich zwei Faktoren eine übergeordnete Rolle: die Größe und die Anzahl sowohl der Gasbläschen als auch der Feststoffpartikel.

- 45 Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Ultraschallkontrastmittel zu schaffen, das die nachfolgend geforderten Eigenschaften besitzt:

1. Lungengängigkeit
2. Kapillargängigkeit
- 50 3. Minimierung des Embolierisikos
 - Gasbläschen (Größe und Anzahl)
 - Feststoffpartikel (Größe und Anzahl)
4. Reproduzierbarkeit
5. Sterile und pyrogenfrei Zubereitung
- 55 6. Leichte Herstellung bei vertretbaren Kosten
7. Problemlose Bevorratung
8. Ausreichend lange Lagerstabilität
9. Wirtschaftlich in der Anwendung.

- 60 Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch ein IV-Kontrastmittel gemäß Anspruch 1 und das Verfahren zu seiner Herstellung gemäß Anspruch 11 gelöst. Erfindungsgemäß wird als Kontrastmittel für intravenöse Verabreichung - IV - eine Zubereitung, enthaltend eine wäßrige Lösung von Polyoxyäthylen-660-12-Hydroxystearat und eines anionischen Phospholipides, eingesetzt.

- 65 Diese erfindungsgemäße Zubereitung wird zum Kontrastmittel weitergebildet durch Einarbeitung eines physiologisch verträglichen Gases in Form feinstverteilter Gasbläschen. Man erhält ein Kontrastmittel, das aus Gasbläschen besteht, die ein Gas und Polyoxyäthylen-660-12-Hydroxystearat und ein negativ geladenes Phospholipid in wäßriger Lösung enthalten.

Die Erfindung stellt ein Ultraschallkontrastmittel dar,

DE 198 05 012 A 1

- auf Basis von Luft oder anderer, physiologisch verträglicher Gase,
- das einen deutlichen Kontrast zum umliegenden Gewebe liefert,
- bei dem die Gasbläschen so klein und stabil sind, daß sie nach IV-Injektion sowohl qualitativ als auch quantitativ, verlustfrei das Linksherz erreichen,
- das sich, ohne allergenes Potential durch gute Verträglichkeit auszeichnet,
- bei dem die Gasbläschen weder in Blut noch in Wasser miteinander verklumpen,
- das sich einfach herstellen läßt.

5

Vorteilhafte Weiterbildungen und erfindungsgemäße Ausgestaltungen des IV-Kontrastmittels sind den kennzeichnenden Merkmalen der Ansprüche 2 bis 10 entnehmbar.

10

Die im Folgenden beschriebenen Zubereitungen unterscheiden sich vom augenblicklichen Stand der Technik dadurch, daß es sich hier um ein Echokontrastmittel handelt, das, entstanden durch geringen mechanischen Aufwand, Mikroluft- bzw.

Mikrogasbläschen enthält und das wegen seiner großen Stabilität, lungengängig ist.

Die Erfindung schlägt zur Herstellung des IV-Kontrastmittels ein Verfahren gemäß Anspruch 11 vor. Vorteilhafte erfinderische Weiterbildungen des Verfahrens zum Herstellen des IV-Kontrastmittels sind den Merkmalen der Ansprüche 12 bis 16 entnehmbar.

15

Hierbei ist besonders hervorzuheben, daß sich das erfindungsgemäße Kontrastmittel durch Variation physiologisch verträglicher, einzuarbeitender Gase modulieren läßt. So ist es hierbei möglich, aus ein und derselben Zubereitung unter Verwendung körpertemperierter, gasförmiger Fluorcarbone – vorwiegend C_3F_8 bis C_6F_{14} – ein wesentlich langlebigeres Echokontrastmittel bzw. NMR-Kontrastmittel herzustellen. Unter Verwendung teilbromierter Fluorcarbone entsteht erfindungsgemäß ein als Röntgenkontrastmittel verwendbares Kontrastmittel.

20

Das für das Kontrastmittel benötigte Gas (Luft) wird der Zubereitung auf mechanischem Wege hinzugefügt. Das von den Gasbläschen transportierte Gasvolumen beträgt 0,01 bis 0,1 ml pro ml Zubereitung. Die Gasbläschen werden durch mechanische Zubereitung generiert und mit dem je nach Indikation zu verwendenden Gas beladen.

25

Durch Zugabe osmotisch aktiver Substanzen kann die physiologische Isotonie des Kontrastmittels hergestellt werden.

Bei dem oben beschriebenen Verfahren zur Herstellung des erfindungsgemäßen Kontrastmittels können Größenverteilungen der Gasbläschen erreicht werden, von denen 90% kleiner als 3 μm sind. Pro Injektion werden 1 ml bis 10 ml des Kontrastmittels benötigt.

Erfindungsgemäß findet das IV-Kontrastmittel Verwendung als aufgeschäumte Zubereitung zur intravenösen Injektion als Diagnostikum bei bildgebenden Verfahren.

30

Nutz man das erfindungsgemäße IV-Kontrastmittel als Ultraschallkontrastmittel, ist nach IV-Applikation nicht nur die Darstellung des rechtsventrikulären Teils des Blutkreislaufs möglich.

Das Kontrastmittel kann vielmehr auch mit exzellenten Ergebnissen bei Untersuchungen des Linksherzes und des Myocards eingesetzt werden.

35

Gleichfalls können andere von Blut versorgte Organe, wie Leber, Milz, Niere und Gehirn, mit o. g. Kontrastmittel sichtbar gemacht werden.

Das erfindungsgemäße Kontrastmittel ist aber auch zum Sichtbarmachen von Hohlräumen in Mensch und Tier geeignet, wie zum Beispiel zur Darstellung der Harnblase, des Harnleiters, des Uterus oder der Vagina.

Überraschenderweise wurde gefunden, daß eine Lösung, bestehend aus Polyoxyethylen-660-12-Hydroxystearat und einem anionischen Phospholipid, in der Lage ist, durch Agitation eingearbeitete, physiologisch verträgliche Gase ebenfalls im arteriellen Kreislauf nach IV-Applikation die akustische Impedanz deutlich zu erhöhen.

40

In den nachfolgenden zwei Beispielen wird die Erfindung detailliert beschrieben, wobei sich die Prozentangaben, soweit nicht anders angegeben, stets auf das Gewicht (g/v) beziehen.

Die Lösung besteht aus 0,5 bis 15% Polyoxyethylen-660-12-Hydroxystearat (bevorzugt 1 bis 5%) und 0,1 bis 10% anionischen Phospholipiden (bevorzugt 0,5 bis 2%). Der Lösung können auch noch physiologisch geeignete Stoffe zur Einstellung der Isotonie beigegeben werden.

45

Beispiel 1

50

Polyoxyethylen-660-12-Hydroxystearat	3,00 g
Dimyristoylphosphatidylglycerol	1,00 g
Natriumchlorid	0,90 g
Aqua dest.	auf 100,00 ml

55

Die Herstellung erfolgt, indem das Polyoxyethylen-660-12-Hydroxystearat bei ca. 65 bis 70°C geschmolzen wird. Anschließend löst man darin das anionische Phospholipid und gibt dann das Wasser und das Natriumchlorid unter Rühren langsam hinzu. Der pH-Wert wird mit verdünnter Natronlauge oder Salzsäure auf 7,0 bis 8,0 eingestellt.

60

Beispiel 2

Polyoxyethylen-660-12-Hydroxystearat	2,00 g
Dipalmitoylphosphatidylglycerol	1,00 g
Glycin	1,50 g
Aqua dest.	auf 100,00 ml

65

DE 198 05 012 A 1

Das Polyoxyethylen-660-12-Hydroxystearat wird bei ca. 65 bis 70°C geschmolzen. Man löst darin das Phospholipid und gibt anschließend langsam das Wasser (65 bis 70°C) hinzu. Das Glycin wird gelöst. Mit Hilfe verdünnter Natronlauge bzw. Salzsäure wird ein pH von 7,0 bis 8,0 eingestellt.

- 5 Zwecks Erzeugung der Mikrogasbläschen kommen alle physiologisch verträglichen Gase in Frage. 1 ml der erfindungsgemäßen Zubereitung wird mit 0,01 bis 0,01 ml Gas aufgeschäumt. Die so entstandenen Mikrobläschen werden vorzugsweise IV injiziert. Ausgerichtet an der diagnostischen Fragestellung kommen 1 bis 20 ml der erfindungsgemäßen Zubereitung zur Injektion.

Herstellung des gebrauchsfertigen Kontrastmittels

- 10 Die Gasbläschen sollten möglichst erst kurz vor der Anwendung am Patienten auf bereits bekannte Weise generiert werden. Bietet man o. a. Substanz beispielsweise in einer Durchstechflasche an, so kann die Lösung zusammen mit der benötigten Menge Luft bzw. Gas in eine marktübliche Spritze aufgezogen werden, die dann mit einer zweiten verbunden wird, um die Lösung unter Druck hin- und herpumpen zu können. Durch diesen Vorgang werden dann die Mikrobläschen
15 generiert. Das Verbindungsstück zur zweiten Spritze kann hierbei ein 3-Wegehahn, ein Adapter mit Querschnittsverengung oder eine anderweitig, strömungsmechanisch wirksame Konstruktion sein.

Echocardiographische Untersuchungen am Hund

- 20 Unter Zuhilfenahme zweier Spritzen, die durch einen 3-Wegehahn miteinander verbunden sind, wird die vorher aufgezogene, erfindungsgemäße Substanz hin- und hergepumpt. Die hierdurch entstandenen Gasbläschen werden in eine periphere Vene injiziert. Anschließend wird mit physiologischer Kochsalzlösung gespült. Ein handelsüblicher für die Echocardiographie geeigneter Ultraschallkopf wird vor, während und nach der Injektion auf die für einen Längsschnitt durch das Links- und Rechtsherz typische Stelle aufgesetzt.

- 25 Unmittelbar nach der Injektion kann man nun auf dem Monitor des Ultraschallgerätes verfolgen, wie das durch das Kontrastmittel markierte Blut über den rechten Vorhof den rechten Ventrikel erreicht und diesen über die Lungenarterie wieder verläßt. Nach der Lungenpassage sind die Höhlen des Linksherz sehr gut erkennbar, während sich die des Rechtsherz wieder leeren. Hierbei ist festzustellen, daß das erfindungsgemäße Kontrastmittel im linken Herzen etwas länger verbleibt als im rechten. Die Intensität des Kontrastes im Ultraschallbild ist in beiden Herzhälften nahezu identisch, so
30 daß davon auszugehen ist, daß die sich in den Gasbläschen befindliche Luft nicht wesentlich reduziert und somit ein nahezu verlustfreier Transport der Gasbläschen selbst durch die Lungenpassage zum linken Herzen gewährleistet ist.

Bei Wiederholung des Versuchs mit Gasbläschen, die mit Gas (vorzugsweise mit Fluorcarbonen) gefüllt sind, ist erstaunlicherweise festzustellen, daß sich die Kontrastdauer in beiden Herzhälften verlängert.

- 35 Als Resultat ergibt sich, daß die erfindungsgemäße Substanz, im Gegensatz zum augenblicklichen stand der Entwicklung in diesem Bereich, auf einfache Weise und reproduzierbar durch Austausch der Gase in seinen bildgebenden Eigenschaften nach Bedarf verändert werden kann. Hierdurch wird gleichzeitig die Palette der Möglichkeiten in der Ultraschalldiagnostik (Herz, Gefäße, Tumorperfusion etc.) erheblich erweitert.

Das erfindungsgemäße IV-Kontrastmittel zeichnet sich aus durch

- 40 – Verdünnbarkeit
– Infusionsfähigkeit
– vergleichbar mit Indikationen in der Radiologie
– für MRI einsetzbar
– Rezirkulation.

- 45 Wegen seiner guten Verträglichkeit ist es auch möglich, das erfindungsgemäße IV-Kontrastmittel intraarteriell zu verabreichen.

Das in den Beispielen eingesetzte Polyethylenglycol-660-12-Hydroxystearat hat folgende Spezifikation:

- Erstarrungspunkt: 25–30°C
50 Verseifungszahl: 53–63
Hydroxylzahl: 90–110
Säurezahl: ≤ 1
Wassergehalt (n.K.F.): ≤ 0,5%
pH-Wert, 10% in Wasser: 6–7
55 Farbe 20% in Wasser: nicht dunkler als Farblösung G5
Viskosität, 30% in Wasser (25°C): ca. 12 mPa-s
Sulfatasche: ≤ 0,3%
Schwermetalle: ≤ 10 ppm
Ethylenoxid: ≤ 1 ppm.

- 60 Die Bestimmungsmethoden sind, soweit nicht anderes angegeben ist, dem derzeit gültigen DAB/Ph.Eur. zu entnehmen.

Die Zusammensetzung besteht aus Polyglykolester der 12-Hydroxystearinsäure (70%) = hydrophober Teil, Polyethylenglykol (30%) = hydrophiler Teil.

- 65 12-Hydroxystearinsäure (12 HSA) ist die Hauptfettsäurekomponente, daneben sind noch Stearinsäure und Palmitinsäure nachweisbar.

DE 198 05 012 A 1

Patentansprüche

1. IV-Kontrastmittel, enthaltend eine Zubereitung auf Basis einer wäßrigen Lösung von Polyoxyethylen-660-12-Hydroxystearat und eines anionischen Phospholipides.
2. IV-Kontrastmittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Zubereitung auf Basis einer wäßrigen Lösung von Polyoxyethylen-660-12-Hydroxystearat und eines anionischen Phospholipides durch Agitation eingearbeitete physiologisch verträgliche Gasen in Form feinstverteilter Gasbläschen enthält. 5
3. IV-Kontrastmittel nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß als physiologisch verträgliches Gas Luft verwendet ist.
4. IV-Kontrastmittel nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß als physiologisch verträgliches Gas gasförmige Fluorkohlenstoffe vorwiegend aus der Gruppe C_3F_8 bis C_6F_{14} verwendet sind. 10
5. IV-Kontrastmittel nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß als physiologisch verträgliches Gas gasförmige teilbromierte Fluorkohlenstoffe verwendet sind.
6. IV-Kontrastmittel nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß 90% der Gasbläschen einen mittleren Durchmesser kleiner $3\ \mu m$ aufweisen. 15
7. IV-Kontrastmittel nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, eine osmotisch aktive Substanz, wie Natriumchlorid, Glycin, zur Herstellung der physiologischen Isotonie enthalten ist.
8. IV-Kontrastmittel nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die wäßrige Lösung 0,5 bis 15 Gew.-%, vorzugsweise 1 bis 5 Gew.-% Polyoxyethylen-660-12-Hydroxystearat und 0,1 bis 10 Gew.-%, bevorzugt 0,5 bis 2 Gew.-% Phospholipide enthält. 20
9. IV-Kontrastmittel nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß als Phospholipide Dimyristoylphosphatidylglycerol eingesetzt ist.
10. IV-Kontrastmittel nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß als Phospholipid ein Dipalmitoylphosphatidylglycerol eingesetzt ist.
11. Verfahren zum Herstellen eines IV-Kontrastmittels zur Verwendung als Diagnostikum bei bildgebenden Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß eine Zubereitung hergestellt wird, indem Polyoxyethylen-660-12-Hydroxystearat bei einer Temperatur von etwa 65 bis 75°C geschmolzen wird, danach ein anionisches Phospholipid in dieser Schmelze gelöst wird und danach destilliertes Wasser und gegebenenfalls Natriumchlorid oder Glycin unter Rühren hinzugegeben wird. 25
12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß das destillierte Wasser in auf eine Temperatur von 65 bis 75°C vorgewärmtem Zustand zugegeben wird. 30
13. Verfahren nach Anspruch 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, daß der pH-Wert der Zubereitung durch Zugabe von Natronlauge oder Salzsäure auf einen Wert von 7,0 bis 8,0 eingestellt wird.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß der Zubereitung physiologisch verträgliches Gas im Volumenverhältnis Zubereitung zu Gas von 1 zu 0,1 bis 1 zu 0,01 zugegeben wird und durch Agitation (mechanisches Mischen) Gasbläschen erzeugt werden. 35
15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß Gasbläschen erzeugt werden, von denen mindestens 90% einen mittleren Durchmesser kleiner als $3\ \mu m$ aufweisen.
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß eine Zubereitung aus 0,5 bis 15 Gew.-Teilen Polyoxyethylen-660-12-Hydroxystearat und 1 bis 5 Gew.-Teilen eines Phospholipides und 100 Gew.-Teilen destilliertem Wasser und 0,5 bis 2 Gew.-Teilen einer osmotisch aktiven Substanz zum Einstellen des pH-Wertes, wie Natriumchlorid oder Glycin, hergestellt wird und 100 Volumenteile der Zubereitung mit 1 bis 10 Volumenteilen eines physiologisch verträglichen Gases unter Ausbildung von Gasbläschen aufgeschäumt werden. 40
17. Verwendung einer aufgeschäumten Zubereitung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 16 zur intravenösen Injektion als Diagnostikum bei bildgebenden Verfahren. 45